·中药工业·

# 龟鹿二仙口服液质量标准研究△

史兆松[1*]，马栋栋[2]，张淹[1]，李士栋[1]，周祥山[1]
1. 东阿阿胶股份有限公司/国家胶类中药工程技术研究中心/山东省胶类中药研究与开发重点实验室，山东　聊城　252201；
2. 华润昂德生物药业有限公司，山东　聊城　252201

［摘要］ **目的**：通过对龟鹿二仙口服液的质量标准进行再研究，建立更简便易操作的定性、定量方法，提高产品的质量标准。**方法**：采用薄层色谱法（TLC）对龟鹿二仙口服液中龟甲、鹿角、党参、枸杞子进行定性鉴别；采用高效液相色谱法（HPLC）对甜菜碱进行含量测定，以丙基酰胺键合硅胶为填充剂，以乙腈-水（80∶20）为流动相，用蒸发光散射检测器检测，理论板数按甜菜碱峰计算应不低于 4000。**结果**：薄层鉴别均斑点清晰，阴性对照无干扰。**结论**：建立的方法操作简便、专属性强、重复性好、结果准确，可作为龟鹿二仙口服液的质量控制标准。

［关键词］ 龟鹿二仙口服液；质量标准；甜菜碱；薄层色谱法；高效液相色谱法
［中图分类号］ R286；R944.1　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1673-4890（2019）04-0494-05
**doi**：10.13313/j.issn.1673-4890.20180724003

**Quality Standards Research on Guiluerxian Oral Liquid**

SHI Zhao-song[1*]，MA Dong-dong[2]，ZHANG Yan[1]，LI Shi-dong[1]，ZHOU Xiang-shan[1]
1. *Dongeejiao Co. Ltd*，*National Engineering Research Center for Gelatin-Based Traditional Chinese Medicine*，*Shandong Provincial Key Laboratory of Gelatine Tcm Research And Development*，*Shandong Liaocheng* 252201，*China*；
2. *Huarun Angde Biotech Pharmaceutical Co. Ltd*，*Shandong Liaocheng* 252201，*China*

［**Abstract**］ **Objective**：To establish simple and convenient methods for qualitative and quantitative analysis of Guiluerxian oral liquid，and improve the quality standard of the product. **Methods**：The qualitative identification of Testudinis Carapax et Plastrum，Saigae Tataricae Cornu，Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma，Lycii Fructus were carried out by TLC. The content of betaine was determined by HPLC. **Results**：The TLC spots were clear with no interference. **Conclusion**：The established methods are simple and convenient，and be used for the quality control of Guiluerxian oral liquid.

［**Keywords**］ Guiluerxian oral liquid；quality standards；betaine；TLC；HPLC

龟鹿二仙口服液由龟甲、鹿角、党参、枸杞子 4 味中药材组成。具有温肾益精的功效，临床上主要用于久病肾虚，腰酸膝软和遗精阳痿等。该产品质量标准中缺少鉴别和含量测定方法，为更好地控制产品质量，保证临床用药安全有效，对质量标准开展再提升研究。分别对龟甲、鹿角、党参、枸杞子四味中药材进行薄层色谱鉴别，对甜菜碱进行含量测定，为产品的质量控制提供数据参考。

## 1　材料

### 1.1 仪器

Ultimate3000 型高效液相色谱仪（Dionex），UltiMate3000 系列光电二极管阵列检测器，色谱柱为丙基酰胺键合硅胶为填充剂（150 mm × 4.6 mm，5 μm）；BS224S 型电子天平（赛多利斯）；C9960A 型超声清洗仪（CBL Photoelectron Technology）；薄层摄像仪（瑞士 CAMAG 公司）；Mili-Qpius 型超纯水制备仪（密理博公司）；硅胶 G 薄层板（青岛海洋化工厂）。

### 1.2 试药

甘氨酸、甜菜碱、党参对照药材、枸杞子对照药材（中国食品药品检定研究院，批号分别为：110735-200102、110894-200503、121057-201206、121072-

△［基金项目］ 国家中药标准化项目（ZYBZH-Y-SD-31）；山东省重点研发计划项目（2016GGH4514）
*［通信作者］ 史兆松，副主任中药师，研究方向：中药质量标准研究；Tel：（0635）3261651，E-mail：shizs@dongeejiao.com

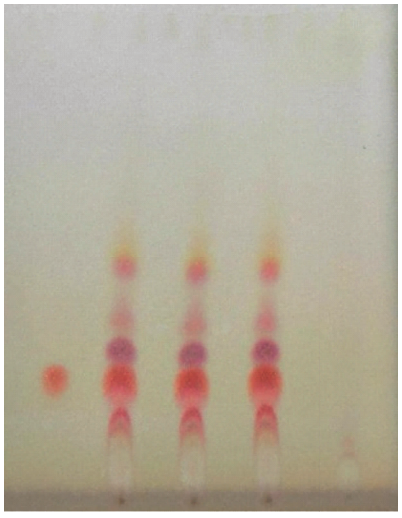
201109)；各阴性对照样品均为自制；乙腈、甲醇均为色谱纯；水为纯化水，其余试剂均为分析纯。

龟鹿二仙口服液产自东阿阿胶股份有限公司，批号分别为：20140601、20140602、20140603、20140801、20150101、20150102、20150103、20150401、20150402、20150403。

## 2　薄层色谱鉴别

### 2.1 甘氨酸鉴别

取本品 1 mL，置具塞试管中，加水 2 mL，盐酸 2 mL，密塞，置 105 ℃干燥箱中加热 6 h，取出，加水 6 mL 摇匀，滤液蒸干，残渣加 10% 乙醇 10 mL 使溶解，作为供试品溶液；取缺龟甲、鹿角的阴性样品同法制成阴性样品溶液。另取甘氨酸对照品，加 10% 乙醇溶解，制成质量浓度为 1 mg·mL$^{-1}$的溶液，作为对照品溶液。吸取供试品溶液及阴性对照溶液各 2 μL、对照品溶液 1 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，展开剂：苯酚-0.5% 硼砂水溶液(4∶1)，展开，取出，晾干，置 105 ℃干燥箱中加热 10 min，取出，立即喷以 2% 茚三酮乙醇溶液，至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。阴性对照色谱中无相应斑点，见图 1。

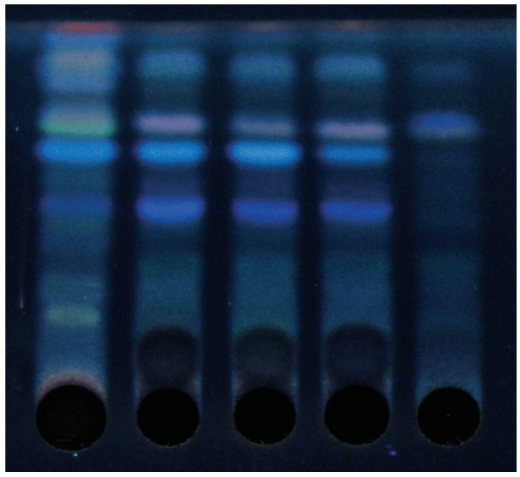



注：1. 甘氨酸；2～4. 样品；5. 阴性样品。

**图 1　甘氨酸薄层色谱图**

### 2.2 党参鉴别

取本品 60 mL，加水饱和的正丁醇振摇提取 3 次(40、40、30 mL)，合并正丁醇提取液，用氨试液洗涤 2 次，每次 20 mL，弃去氨液，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇 1 mL 使溶解，作为供试品溶液。取缺党参的阴性样品同法制成阴性样品溶液。另取党参对照药材 4 g，分别加水 30 mL 煎煮两次，每次 30 min，合并煎液，滤过，滤液同法制成党参对照药材溶液。吸取上述 3 种溶液各 20 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，展开剂：甲苯-乙酸乙酯-甲酸(15∶2∶2)，展开，取出，晾干，喷以硫酸-乙醇(1∶1)，置 105 ℃干燥箱中加热约 7 min，置紫外光灯(365 nm)下检视，供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。阴性对照色谱中无相应斑点，见图 2。




注：1. 党参对照药材；2～4. 样品；5. 阴性样品。

**图 2　党参薄层色谱图**

### 2.3 枸杞子鉴别

取 **2.2** 项下制备的供试品溶液。取缺枸杞子的阴性样品和枸杞子对照药材 2 g，同 **2.2** 项方法制成阴性样品和对照药材溶液。点样、展开、显色等操作同 **2.2** 项下方法。结果见图 3。

注：1. 枸杞子对照药材；2～4. 样品；5. 阴性样品。

**图 3　枸杞子薄层色谱图**

## 3　含量测定

**3.1** 色谱条件与系统适用性试验

采用 HILIC（丙基酰胺键合硅胶）色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；以乙腈-水（80:20）为流动相；柱温为 30 ℃；蒸发光散射检测器检测漂移管温度为 98 ℃；体积流速为 0.8 mL·min$^{-1}$。

**3.2** 甜菜碱对照品溶液

精密称取甜菜碱，加水溶解制成质量浓度为 0.5 mg·mL$^{-1}$的溶液，即得。

**3.3** 供试品溶液制备

精密吸取本品 20 mL，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇 40 mL，密塞，称定质量，超声处理（功率：800 W，频率：40 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用 80% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，滤液蒸干，残渣加水 10 mL 使溶解，先上预处理的阴离子树脂柱（内径为 1.5 cm，柱高为 15 cm），用 40 mL 水洗脱，收集洗脱液，后上预处理的阳离子树脂柱（内径为 1.5 cm，柱高为 15 cm），用 40 mL 水洗脱至无色，弃去洗脱液，再用 15% 氨水溶液40 mL 洗脱，收集洗脱液，蒸干，残渣加适量水溶解，转移至 10 mL 量瓶中，加水至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

**3.4** 阴性样品溶液制备

精密吸取缺枸杞子的阴性样品 20 mL，同 **3.3** 项方法制成。

**3.5** 专属性试验

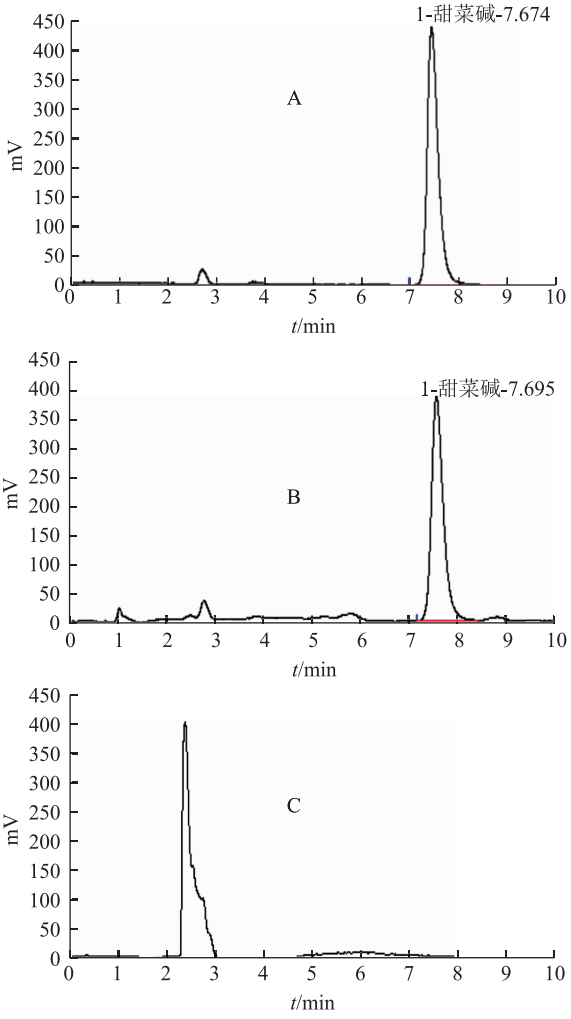
分别精密吸取上述 3 种溶液各 5 μL，按照 **3.1** 项下色谱条件进行测定。结果表明，阴性对照无干扰，见图 4。理论板数按甜菜碱峰计算应不低于 4000。

**3.6** 检测限及定量限

将甜菜碱对照品色谱峰测出的信号与空白样品测出的信号进行比较，分别以信噪比为 3:1 及 10:1 时注入液相色谱仪的量确定检测限与定量限，检测限为 0.68 ng，定量限为 2.40 ng。

**3.7** 线性关系考察

精密称取甜菜碱 4.12 mg，置 10 mL 量瓶中，加水溶液至刻度，摇匀。分别吸取 2.5、5、7.5、10、12.5、15 μL，按照 **3.1** 色谱条件依次进样，测定峰面积。以对照品的浓度为横坐标，峰面积积分值为纵坐标，得回归方程：$Y = 30.828\ X + 23.654$，$r = 0.999\ 9$。甜菜碱在 1.03～6.18 μg 呈良好线性关系。




注：A. 对照品；B. 供试品；C. 阴性对照样品。

**图 4　甜菜碱 HPLC 图**

**3.8** 精密度试验

取 **3.2** 项下对照品溶液，重复进样 6 次，每次 10 μL，按照 **3.1** 色谱条件测定峰面积，计算 RSD 为 1.47%（$n = 6$），结果表明仪器精密度良好。

**3.9** 稳定性试验

精密量取本品（批号：20140801）20 mL，按照 **3.3** 项方法制备，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 6 次，每次进样 5 μL，测得峰面积，计算 RSD 为 2.38%，结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**3.10** 重复性试验

精密量取本品（批号：20140801）6 份，按照 **3.3** 项方法平行制备，按照 **3.1** 项色谱条件，分别进样 5 μL 测定，甜菜碱平均含量为 0.226 mg·mL$^{-1}$，RSD 为 1.07%（$n = 6$），结果表明重复性良好，方法可行。

**3.11** 加样回收率试验

精密量取质量浓度为 0.225 5 mg·mL$^{-1}$的甜菜碱样品(批号：20140801)共 6 份，每份 10 mL，分别精密加入甜菜碱对照品溶液(质量浓度为 0.488 mg·mL$^{-1}$)各 6 mL，再加水至 20 mL，制备 6 份供试品溶液，按照 **3.1** 项色谱条件，分别进样 5 μL 测定，计算回收率及 RSD，结果见表 1。

**表 1　加样回收率试验结果**($n$=6)

| 取样量/mL | 供试品量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 2.255 | 2.928 | 5.206 | 100.79 | 100.22 | 2.1 |
| 10 | 2.255 | 2.928 | 5.152 | 98.94 | | |
| 10 | 2.255 | 2.928 | 5.126 | 98.05 | | |
| 10 | 2.255 | 2.928 | 5.264 | 102.77 | | |
| 10 | 2.255 | 2.928 | 5.256 | 102.49 | | |
| 10 | 2.255 | 2.928 | 5.132 | 98.26 | | |

**3.12** 耐用性试验

取本品按照 **3.1** 项下方法试验，因甜菜碱为水溶性生物碱成分，很难在 $C_{18}$柱上有所保留，并且无特异的紫外吸收，故确定选用 HILIC 色谱柱按照 **3.1** 项下的色谱条件对其进行测定，含量测定结果无明显差别。

**3.13** 样品测定

精密量取 10 批龟鹿二仙口服液样品(批号分别为：20140601、20140602、20140603、20140801、20150101、20150102、20150103、20150401、20150402、20150403)，按照 **3.3** 项下方法制备供试品溶液，按照 **3.1** 项色谱条件，分别进样 5 μL 测定，结果见表 2。

**表 2　样品测定结果**($n$=10)

| 批号 | 平均含量/mg·mL$^{-1}$ | RSD/% |
|---|---|---|
| 20140601 | 0.186 | 1.8 |
| 20140602 | 0.170 | 1.7 |
| 20140603 | 0.193 | 2.2 |
| 20140801 | 0.226 | 2.1 |
| 20150101 | 0.268 | 1.5 |
| 20150102 | 0.217 | 2.4 |
| 20150103 | 0.152 | 2.2 |
| 20150401 | 0.393 | 1.5 |
| 20150402 | 0.379 | 1.7 |
| 20150403 | 0.404 | 1.9 |

## 4　讨论

龟鹿二仙口服液是由龟甲、鹿角、党参、枸杞子 4 味中药材组成的中药复方制剂，本研究通过色谱分离技术对处方中主要成分进行定性、定量分析。进一步提升了龟鹿二仙口服液质控水平，由于处方中成分复杂，分离困难、干扰多，通过上阴、阳离子树脂柱进行洗脱，除去氨基酸、蛋白质、多糖等成分，达到纯化供试品溶液的目的，使含量测定结果准确可靠。

原标准中仅采用定氮法测总氮量，专属性不强、产品质量标准较低。通过对处方成分分析，对产品中枸杞子有效成分之一甜菜碱进行研究，建立了 HPLC 含量测定方法。甜菜碱系甘氨酸的三甲基衍生物，季胺型水溶性生物碱，基本结构为$(CH_3)_3$-$N^+$-$CH_2$-$COO^-$，分子式为 $C_5H_{11}NO_2$，分子质量为 117.11，无共轭结构。纯化方法曾采用 0.1 mol·L$^{-1}$异硫氰酸苯酯(PITC)乙腈溶液及 1 mol·L$^{-1}$三乙胺的乙腈溶液衍生后测定，发现衍生后未检测出理想甜菜碱成分峰；样品采用单阳离子柱洗脱后，测得成分峰很多且有重叠，甜菜碱成分分离度不理想。供试品选用上阴、阳离子柱洗脱处理后，杂质成分较少，没有出现干扰峰，且甜菜碱成分峰分离度较好。

本文对处方中全部药味均进行了薄层鉴别，在甘氨酸鉴别中，最初采用正丁醇-乙酸-水(3∶1∶1)为展开剂，但存在拖尾及背景干扰等缺点，经摸索，以苯酚-0.5% 硼砂水溶液(4∶1)为展开剂时，分离度较好，展开效果理想，且在 105 ℃加热 10 min 再喷显色剂比晾干后显色要好；在显色剂方面，2% 茚三酮乙醇溶液比 0.2% 茚三酮乙醇溶液效果更明显。对党参、枸杞子鉴别中，分别选择各自对照药材作对照，在本实验选择确定的薄层色谱条件下，斑点清晰，分离度好，阴性对照无干扰。

龟鹿二仙口服液选取甜菜碱作为控制制剂质量的首选目标，根据《中华人民共和国药典》2015 年版规定[1]，枸杞子药材按干燥品计算，含甜菜碱不得少于 0.30%，依据龟鹿二仙口服液处方，建议含量测定限度为不得少于 0.15 mg·mL$^{-1}$。

## 参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:249.

(下转第 507 页)

征峰，97 批次样品中有 47 批次未检出豆蔻的特征峰；C 企业生产的 5 批次样品均未检出荆芥穗和豆蔻的特征峰；D 企业生产的 8 批次样品均未检出荆芥穗特征峰。显示部分企业存在不投或少投药材，使用劣质药材投料的违规生产行为，或者是药材的灭菌方式不合理，造成药材的挥发性成分的流失。

不同企业间样品各特征峰峰面积差异较大，企业内样品各特征峰峰面积差异不大，表明不同企业间投料药材质量差异较大，企业内批次间投料药材质量较稳定。

本实验中供试品溶液制备方法考察了乙酸乙酯超声提取、乙酸乙酯回流提取、挥发油提取器提取等方法，发现回流提取样品溶液过于黏稠，超声提取图谱峰整体性差，挥发油提取器提取挥发性成分图谱整体性好，峰数目多且分离度好，故选取挥发油提取器提取方法制备供试品溶液。

分别对女宝胶囊中肉桂、炮姜、白术、砂仁、荆芥穗、豆蔻 6 味药材的挥发油提取液和相应的阴性对照挥发油提取液及相应的对照品溶液进行气相图谱测定，通过药材、阴性对照溶液和对照品溶液的图谱，提取出相应的药材特征峰。

文中 2.4.3 项下给出的供试品溶液色谱图是按照正常工艺自制小样分析得出的色谱图，具有可靠性和代表性，是符合该品种特点的特征性色谱图。

通过建立女宝胶囊的特征图谱方法，可以达到一测多评的目的，从整体上对多味药材的质量进行综合控制，并为女宝胶囊的质量评价提供可靠的依据。

## 参考文献


[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准：第五册[M]. 北京：化学工业出版社，1989：18.

[2] 刘敏，李水福. HPLC 同时测定女宝胶囊中丹皮酚和丹参酮ⅡA 含量的方法学研究[J]. 中华中医药学刊，2011，29(6)：1407-1409.

[3] 邹录惠，邱莉. SPE-HPLC-UV 法测定山楂药材特征图谱研究[J]. 药物分析杂志，2014，34(9)：1597-1600.

[4] 张永鑫，刘晓. 黄连 4 种饮片特征图谱研究及生物碱含量测定[J]. 药物分析杂志，2012，32(11)：1957-1961.

[5] 马培，许利嘉. 虎杖药材 UPLC 特征图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(2)：72-76.

[6] 宋霞，林鹏程. 明目蒺藜丸中挥发性成分的 GC 特征图谱及有效成分的含量测定[J]. 中药材，2017，40(8)：1880-1883.

[7] 任乔森，王海洋. 朝鲜白头翁的 HPLC 特征图谱研究[J]. 中国现代中药，2018，20(6)：711-715.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 北京：中国医药科技出版社，2015：168.

[9] 郭美玲，冯振斌. 通窍耳聋丸 UPLC 特征图谱的研究[J]. 中国药品标准，2016，17(6)：415-417.


（收稿日期：2018-04-02　　编辑：王笑辉）

（上接第 497 页）


[2] 张建华，甘银凰，张汉贞. 阿胶的薄层鉴别与《药典》权威性商讨[J]. 时珍国医国药，2006，17(9)：1864.

[3] 许明旺，袁秀枝，刘焱文，等. HPLC 测定复方龟鹿颗粒中甜菜碱的含量[J]. 中国中药杂志，2006，31(6)：462.

[4] 陈树和，许明旺，刘焱文，等. 龟鹿二仙膏的质量标准研究[J]. 中医药学刊，2004，22(7)：1352.

[5] 王健，蒋亚南，李逢春，等. 艾附暖宫软胶囊的质量标准研究[J]. 中国现代中药，2018，20(5)：616-621.

[6] 姚少威，宋金春，李玉琴，等. 高效液相色谱法测定复方枸杞颗粒中甜菜碱的含量[J]. 中国医院药学杂志，2005，25(3)：225-227.

[7] 何慧，尹宁宁，郭东晓. 复方阿胶颗粒质量标准研究[J]. 中成药，2013，35(10)：2182-2188.

[8] 王春艳，李士栋，张淹，等. 通脉颗粒质量标准研究[J]. 齐鲁药事，2010，29(9)：528-530.

[9] 谢若男，杨满琴，王丽，等. 十二味阿胶膏质量标准研究[J]. 中医药临床杂志，2018，30(11)：2153-2156.

[10] 蓝保强，何蔚，邓聿胤，等. 颈康酊质量标准的建立[J]. 中国药师，2019，22(1)：188-190.

[11] 陈雷，史敏，李杨，等. 脑复康宁胶囊的质量标准研究[J]. 西北药学杂志，2019，34(1)：5-8.


（收稿日期：2018-07-24　　编辑：王笑辉）